

L28 ANSWER 1 OF 6 WPIDS COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD
AN 97-316496 [29] WPIDS
DNC C97-102059
TI Water soluble combination of drug and pullulan - used for treating liver
for treatment of e.g. cancer and infectious diseases, etc..
DC B04 B07
PA (SEIS) SEISAN KAIHATSU KAGAKU KENKYUSHO
CYC 1
PI JP09124512 A 970513 (9729)* 5 pp A61K-047-36 <--
ADT JP09124512 A 95JP-0315760 951026
PRAI 95JP-0315760 951026
IC ICM A61K-047-36
ICS A61K-009-08; A61K-045-00
AB JP09124512 A UPAB: 970716

Water soluble combination of a drug, particularly having molecular weight
of at least 3,000, esp. oligo- or poly-peptide drug, and combination of a
drug and water soluble pullulan targetting the liver, is new.

Preferably drug for treatment of the liver is bound with pullulan by
chemical binding e.g. cyanuric chloride.

USE - The combination is used for selective treatment of liver
diseases including cancer, infectious diseases, disturbance of circulation
and inflammation by targetting the liver.

In an example, in 3 ml of an aqueous solution containing 50 mg
pullulan, 1 ml of DMF containing 20 mg/ml cyanuric chloride was added and
stirred for 3 hours to introduce cyanuric acid residue in OH group of
pullulan. The product was purified and 1 ml of egg white lysozyme (Lyz) at
a concentration of 40 micro-g/ml was added to effect reaction at 4 degrees
C for 12 hours and to give Lyz-pullulan. The product is useful for
selective introduction of Lyz in liver.

Dwg.0/0

(19) 【発行国】 日本国特許庁 (JP)

(12) 【公報種別】 公開特許公報 (A)

(11) 【公開番号】 特開平9-124512

(43) 【公開日】 平成9年(1997)5月13日

(54) 【発明の名称】 肝臓ターゲティングのための水溶性の薬物-ペルラン結合体製剤

(51) 【国際特許分類第6版】

A61K 47/36

9/08

45/00

【FI】

A61K 47/36 B

9/08 F

45/00

【審査請求】 未請求

【請求項の数】 3

【出願形態】 書面

【全頁数】 5

(21) 【出願番号】 特願平7-315760

(22) 【出願日】 平成7年(1995)10月26日

(71) 【出願人】

【識別番号】 000002336

【氏名又は名称】 財団法人生産開発科学研究所

【住所又は居所】 京都府京都市左京区下鴨森本町15番地

(72) 【発明者】

【氏名】 筏 義人

【住所又は居所】 京都府宇治市五ヶ庄広岡谷2-182

(19) [Publication Office] Japanese Patent Office (JP)

(12) [Kind of Document] Published Unexamined Patent Application (A)

(11) [Publication Number of Unexamined Application (A)] Laid-Open Patent HEI{SEI} 9-124512

(43) [Publication Date of Unexamined Application] Heisei 9 year (1997) May 13 day

(54) [Title of Invention] WATER SOLUBLE DRUG -PULLULAN-BOUND CARRIER FORMULATION FOR LIVER TARGETING.

(51) [International Patent Classification 6th Edition]

A61K 47/36

9/08

45/00

[FI]

A61K 47/36 B

9/08 F

45/00

【Request for Examination】 Examination not requested

【Number of Claims】 3

【Form of Application】 Document

【Number of Pages in Document】 5

(21) [Application Number] Patent application Hei 7-315760

(22) [Application Date] Heisei 7 year (1995) October 26 day

(71) [Applicant]

【Applicant Code】 000002336

【Name】 RESEARCH INSTITUTE FOR PRODUCTION DEVELOPMENT

【Address】 Kyoto Prefecture Kyoto City Sakyo-ku Shimogamo Morimoto-cho 15

(72) [Inventor]

【Name】 Ikada, Yoshito

【Address】 Kyoto Prefecture Uji City Gokasho Hiraokatani 2-182

(72) 【発明者】

【氏名】 田畠 泰彦

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、生体内で不安定な薬物を水溶性の高分子運搬体プルランにて結合することにより、薬物の体内動態を変化させ、特に、薬物の肝臓へのターゲティングを可能とする投与剤形を提供する。

【効果】 本発明の水溶性の薬物-プルラン結合体製剤は、薬物に肝臓へのターゲティング性を付与させることができ、そのため、薬効発現のための薬物投与量を低下できる。その結果、薬物の大量投与、およびその標的指向性の低さに原因する副作用を低減させることができとなる。肝臓癌、肝炎に対する抗ガン剤、抗炎症剤による治療の他、肝臓に関する細菌あるいはウイルス感染症の予防薬、治療薬としての用途が期待できる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 薬物の肝臓へのターゲティングを目的とした、薬物と水溶性多糖プルランとからなる水溶性の結合体製剤。

【請求項 2】 用いる薬物の分子量が 3,000 以上である請求項 1 に記載の肝臓ターゲティングのための薬物-プルラン水溶性結合体製剤。

【請求項 3】 用いる薬物の分子量が 3,000 以上のオリゴあるいはポリペプチド性薬物である請求項 1 に記載の肝臓ターゲティングのための薬物-プルラン水溶性結合体製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、薬物と水溶性多糖プルランとを含んでなる水溶性薬物-プルラン結合体製剤、ならびにそれらの水溶性結合体製剤の肝臓へのターゲティングと薬効の増強に関する。

【0002】

【従来の技術】 患者への薬物の投与においては、服用とか注射などの方法によるのが一般的である。投与された薬物は、その生体内における濃度が一定以下ではその薬効は発揮されず、また、逆に、高すぎる場合には、その副作用の影響を無視できない。現在、用いられている薬物の生体内での生物学的寿命は短く、さらにその標的作用部位への指向性も低いため、薬物の効果を発現させる方法として多量の薬物投与が行われている。このことが薬物の副作用を助長している原因の一つであると考えられる。

(72) [Inventor]

[Name] Field Yasuhiko

(57) [Abstract]

[Objective] This invention internal dynamics of drug changing by with inside the body connecting the unstable drug with water soluble polymeric carrier pullulan, especially, offers formulation which makes the targeting to liver of drug possible.

[Effect(s)] As for water soluble drug -pullulan-bound carrier formulation of this invention, it is possible, to grant targeting ability to the liver to drug, because of that, drug dose for manifestation of drug effect it can decrease. As a result, it becomes possible to decrease side effect of cause in lowness of drug large dose administration, and its target indicator characteristic. You can expect application other than remedy due to anticancer agent and the antiinflammation agent for liver cancer and hepatitis, prevention drug of bacterial or viral infection regarding liver, as therapeutic.

[Claim(s)]

[Claim 1] Water soluble bound carrier formulation which designated targeting to liver of drug as the object, consists of drug and water-soluble pullulan.

[Claim 2] Drug -pullulan water-soluble carrier formulation for liver targeting which is stated in Claim 1 where molecular weight of drug which it uses is 3,000 or greater.

[Claim 3] Drug -pullulan water-soluble carrier formulation for liver targeting which is stated in Claim 1 where molecular weight of drug which it uses is oligo or polypeptide drug of 3,000 or greater.

[Description of the Invention]

[0001]

[Field of Industrial Application] As for this invention, including with drug and water-soluble pullulan, water solubility drug -pullulan-bound carrier formulation which becomes. And it regards targeting to liver of those water-soluble carrier formulation and reinforcement of drug effect.

[0002]

[Prior Art] At time of prescribing drug to patient, it is general due to administration or injection or other method. As for drug which is prescribed, concentration in inside the body cannot be shown, below uniformity as for drug effect in addition, when conversely, it is too high, cannot ignore influence of side effect. Presently, biological lifetime with inside the body of drug which is used is short, because furthermore also indicator characteristic to targeted action site is low, the drug administration of large amount is done as method which reveals effect of the drug. It is thought that it is a one

【0003】 いずれにしても、生体内に投与された薬物のうち、活性を保持したまま標的部位に到達した薬物のみが治療効果を示し、残りの部分は無効となるか、あるいは場合によっては不必要な部位に作用して副作用の原因となる。従って、薬物を標的部位に選択的に作用させることができることが、薬物療法を有効に行うための必須条件である。生体内で標的部位を指向する性質を薬物に与えることを標的指向化（ターゲティング）というが、このターゲティング性を薬物に付与することができるならば、薬効を発現させるための投与薬物量を低下できるとともに、大量投与による薬物の副作用の低減も期待できる。

【0004】 ターゲティング化はすべての薬物において基本となる考え方であるが、特に、細胞毒性と副作用が強く、治療係数が小さくて投与方法の難しい抗ガン剤をはじめとして、抗菌剤、循環器用薬、抗炎症薬などがその研究開発の対象として挙げられている。しかし、低分子量の有機薬品や抗生素質は生体からの排泄が速く、それ自身がある臓器に対して特異性をもたない限り、その薬効は期待できない。

【0005】 また、近年の遺伝子工学の進歩により、医薬品の候補物質となってきた種々の生理活性ペプチド、および遺伝子治療に用いられる核酸（例えはアンチセンスDNA）なども、その生体内での寿命は短く、ターゲティングが必要となる。薬物をそのままの形で投与すると、生体内環境で不活性化されたり、目的外の部位へ移行するため、標的に到達せずに副作用を生じる。このような薬物に対しては、標的部位に何らかの親和性を有する物質を運搬体に用い、その運搬体の体内挙動パターンに薬物を乗せることによって、ターゲティングが達成できる。

【0006】 このような、運搬体を用いた薬物のターゲティングには、薬物運搬体自身の体内での運命を知っておくことが必要である。しかしながら、薬物運搬体としての水溶性高分子の体内動態に関する系統的な研究はあまり行われていない。わずかに、水溶性多糖であるデキストランおよびその誘導体に関する研究が行われているに過ぎない（例えは、Hashida, M. 等、J. Controlled Release, 31巻, p163, 1994など）。

【0007】 そこで、本発明者らは、種々の合成ならびに天然水溶性高分子の生体内分布を調べ、その分布がその分子量ならびに電荷などの影響を強くうけること、およびプルランがそれらの中で最も高い肝臓への親和性を示すことを見出した（Yamaoka, T. 等、Drug delivery, 1巻, p75, 1993）。

【0008】 プルランは、デンプンの部分加水分解物を原料として *Aureobasidium pullulans* 菌により発酵産生される α -グルカンであり、ブドウ糖3個よりなるマルトトリオースが α -1, 6結合で連鎖した直鎖状

of cause where this has promoted side effect of drug

[0003] In any case, among drug which are prescribed to inside the body, while the activity is kept only drug which arrives in targeted action site to show the remedial effect, remaining portion becoming invalid, or operating the unnecessary site depending upon when it becomes cause of side effect. Therefore, drug selectively fact that it operates, is required condition in order to do drug therapeutic method effectively in target site. You call that property which points target site with inside the body is given to drug targeting (targeting) if, but this targeting ability is granted to the drug as administered dosage in order to reveal drug effect it can decrease, you can expect also decrease of side effect of drug due to the large dose administration.

[0004] Conversion for targeting is method of thinking of becoming basis in all drug, but especially, cytotoxicity and side effect are strong, therapeutic index being small, with anticancer agent where administration method is difficult as beginning, antibacterial agent, the cardiovascular drug and anti-inflammation drug etc it is listed as object of research and development. But, if it does not have specificity vis-a-vis organ where organic chemical and antibiotic of low molecular weight excretion from organism are quick, is that itself, you cannot expect drug effect.

[0005] In addition, various physiological activity peptide which becomes candidate substance of drug depending upon progress of genetic engineering of recent years, and nucleic acid (for example antisense DNA) etc which is used for genetic therapeutic, lifetime with in-vivo becomes short, the targeting with necessary. When drug is prescribed in existing form, in order to inactivation is done with in-vivo environment, to move to site outside objective, without arriving in target, it causes side effect. Vis-a-vis this kind of drug, it uses substance which possesses a some affinity in targeted action site for carrier, it can achieve targeting by placing the drug in inside the body behavior pattern of carrier.

[0006] This kind of, it is necessary in targeting of drug which uses the carrier to know destiny with inside the body of drug carrier itself. But, as drug carrier systematic research regarding internal dynamics of water soluble polymer is not excessively done. Barely, research regarding dextran and its derivative which are a water-soluble polysaccharide only is done, (Such as J. Controlled Release, Vol.31, p163 and 1994 such as for example Hashida, M.).

[0007] Then, these inventors inspect distribution in the body of various synthesis and natural water soluble polymer, the distribution receives molecular weight and electric charge or other influence strongly, and the fact that pullulan shows affinity to highest liver among those was discovered, (Drug Delivery, Vol.1 and p75, 1993 such as Yamaoka, T.).

[0008] Pullulan fermentation is α -glucan which is produced with *Aureobasidium pullulans* microbe with the partial hydrolysis product of starch as starting material, maltotriose which consists of the fructose 3 being α -1,6-bond, is water soluble polymer of

の水溶性高分子である。現在、食品添加剤および医薬品補助剤として広く使われている（川原一男、製薬工場、4巻、p 125、1984）。

【0009】薬物の肝臓へのターゲティングに関しては、正電荷をもつデキストラン（Takakura, Y. 等、Pharm. Res., 7巻、p 339、1990）あるいはリポソーム（Scherphof, G. L. 等、Biochem. Soc. Trans., 15巻、p 345、1987）、アルブミン微粒子（Sugibayashi, K. 等、Chem. Pharm. Bull., 27巻、p 204、1979）などを運搬体に用いた受動的ターゲティング、ならびにアシアロフェチ（Fiume, L. 等、FEBS Letter, 116巻、p 185、1980）、ガラクトシル化アルブミン（Fiume, L. 等、FEBS Letter, 146巻、p 42、1982）、ガラクトース修飾リポソーム（Das, P. K. 等、Biochem. Med., 33巻、p 124、1985）などを用いた能動的ターゲティングなどの多くの研究がこれまでに報告されているが、これらの研究においては、ブルランを用いることによって、薬物を肝臓へターゲティングすることについては示唆されていない。

【0010】また、Usui, M. 等の報告（J. Immunol., 122巻、p 1266, 1979）には、ブルランを用いた卵アルブミンの化学修飾についての記載があるが、これはブルラン修飾による卵アルブミンに対するIgE産生の抑制についての報告であり、ブルラン修飾による肝臓へのターゲティングについては記載されていない。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、生体内で不安定な薬物を水溶性の高分子運搬体ブルランにて結合することにより、薬物の体内動態を変化させ、特に、薬物の肝臓へのターゲティングを可能とする投与剤形を提供しようというものである。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の問題点を解決するために鋭意検討した結果、肝臓への親和性の高いブルランを用いて薬物を化学修飾することにより、薬物の肝臓へのターゲティングが可能となり、肝臓における薬物の薬効発現が極めて有利となることを見出し、本発明を完成した。

【0013】以下、本発明の技術的構成を詳しく説明する。本発明の薬物—ブルラン結合体製剤は以下の方法によって得ることができる。ブルランの水溶液中へ塩化シアヌルのジメチルホルムアミド溶液を加え、ブルランにシアヌル残基を導入する。反応後、ゲル通過にて未反応の塩化シアヌルを除去する。次に、薬物を含む水溶液中へ、これらのシアヌル化ブルランを投入し、薬物とブルランとを化学結合させる。反応生成物をゲル通過することにより、結合していない薬物を分

straight chain which linkage is done. It is used widely presently, as food additive and drug auxiliary agent, (Kawahara Kazuo, Seiyaku Koba, Vol.4, p125 and 1984).

[0009] In regard to targeting to liver of drug, dextran which has positive electric charge (Pharm. Res., Vol.7, p339 and 1990 such as Takakura, Y.) or liposome (Biochemical Society Transactions, Vol. 15, p345 and 1987 such as Scherphof, G.L.), passive targeting, and asialofetuin which use albumin fine particle (Chemical & Pharmaceutical Bulletin (0009-2363, CPBTAL), Vol.27, p204 and 1979 such as Sugibayashi, K.) etc for the carrier (FEBS Letter, Vol. 116, p185 and 1980 such as Fiume, L.), galactosylated albumin (FEBS Letter, Vol.146, p42 and 1982 such as Fiume, L.), active targeting or other many research which uses galactose-modified liposome (Biochem. Med., Vol.33, p124 and 1985 such as Das, P.K.) etc is reported so far, but doing concerning to liver by using pullulan at time of these researching, drug targeting is not suggested.

[0010] In addition, there is statement concerning chemical modification of egg albumin which uses pullulan in Usui, M. or other report (Journal of Immunology (0022-1767, JOIMA3), Vol.122 and p1266, 1979), but this is report concerning control of IgE production for egg albumin due to pullulan modification, concerning targeting to liver due to pullulan modification it is not stated.

[0011]

[Problems to be Solved by the Invention] This invention internal dynamics of drug changing by with inside the body connecting the unstable drug with water soluble polymeric carrier pullulan, is something which especially, will offer the formulation which makes targeting to liver of drug possible.

[0012]

[Means to Solve the Problems] Fact that manifestation of drug effect of drug where as for these inventors targeting to liver of drug becomes possible by chemical modification doing the drug result of diligent investigation, making use of pullulan where affinity to the liver is high in order to solve above-mentioned problem, in the liver quite becomes profitable was discovered, this invention was completed.

[0013] Below, technically constitution of this invention is explained in detail. It can acquire drug-pullulan-bound carrier formulation of this invention with method below. Including dimethylformamide solution of cyanuryl chloride to in aqueous solution of pullulan, the cyanuryl residue is introduced into pullulan. After reacting, unreacted cyanuryl chloride is removed with gel filtration. Next, it throws these cyanurated pullulan to in aqueous solution which includes drug, the chemical bond does drug and pullulan, drug

離除去し、水溶性の薬物—プルラン結合体を得る。

【0014】本発明に用いる薬物としては、抗ガン剤をはじめ、抗菌剤、循環器用薬、抗炎症薬、およびホルモンなどの低分子量薬物、およびインターフェロン、インターロイキン、種々の分化増殖因子、成長因子などのポリペプチド薬物、さらにアンチセンスDNAを含む核酸などの種々のものを用いることができる。

【0015】本発明に用いられるプルランとしては特に限定されないが、中でも、肝臓へのターゲティング性が高いことから、その分子量が20,000以上のプルランが好ましい

【0016】また、薬物とプルランとの結合反応としては、過ヨウ素酸酸化法、塩化シアヌル法、臭化シアン法、あるいはエピクロロヒドリン法などのプルランの水酸基と薬物のアミノ基との間に化学結合を形成させるものであれば、特に限定されるものではないが、塩化シアヌル法が好適である。特に、薬物がペプチドあるいはポリペプチド性のものである場合には、結合反応時のpHは7付近、温度は例えば4°Cなどの低温が好ましい。また、プルランの水酸基へカルボキシル基を導入した後カルボジイミド、N-ヒドロキシスукシニミド・カルボジイミド、クロロロ炭酸エチルなどを用いたプルランのカルボキシル基と薬物のアミノ基との間の結合反応、プルランの水酸基へアミノ基を導入した後に、カルボジイミドなどを用いたプルランのアミノ基と薬物のカルボキシル基との間の結合反応、ならびにプルランの水酸基へアミノ基を導入した後、塩化シアヌルなどを用いたプルランのアミノ基と薬物のアミノ基との間の結合反応なども、薬物—プルラン結合体製剤を作製するために有用である。なお、プルランと薬物との配合比は特に限定されるものではないが、プルランの水酸基に対して0.1から10モル%の配合比が好ましい

【0017】本発明の薬物—プルラン結合体製剤は水溶性であり、そのまま緩衝液、生理食塩水、注射用溶媒などの希釈剤に溶解してアッセイあるいは治療に用いることができるが、凍結乾燥後、使用時に希釈剤に溶解してから用いてもよい

【0018】本発明の薬物—プルラン水溶性結合体製剤は原薬物に比べて次の優れた性質をもつ。

- 1) 不安定な薬物の生体内安定性が顕著に増加する。
- 2) 薬物の体内動態を変化できる。特に、その肝臓へのターゲティング能が顕著に高まり、原薬物に比較して、より少ない薬物投与量でその薬効が発揮される。
- 3) 肝臓における薬効が、原薬物に比較してより長く持続す

which has not been connected by gel filtration doing reaction product, the separation and removal is done, water soluble drug-pullulan-bound carrier is obtained.

[0014] antibacterial agent, cardiovascular drug, anit-inflammation drug, and hormone or other low molecular weight drug, and interferon, the interleukin, various cell growth factor and growth factor or other polypeptide drug, furthermore nucleic acid or other various ones which includethe antisense DNA can be used in addition to anticancer agent as drug which isused for this invention.

[0015] As pullulan which is used for this invention especially it is not limited, but, from fact that targeting ability to liver is high, molecular weight thepullulan of 20,000 or greater is desirable even among them

[0016] In addition, if it is something which forms chemical bond with hydroxyl of periodic acid oxidation method, cyanuryl chloride method, cyanogen bromide method or epichlorohydrin method or other pullulan and amino group of thedrug as binding reaction of drug and pullulan, is not something whichespecially is limited, but cyanuryl chloride method is ideal. Especially, when drug is things such as peptide or polypeptide-like, as for pH at time of binding reaction as for 7 vicinity and the temperature for example 4 °C or other low temperature is desirable. In addition, after introducing carboxyl group to hydroxyl of pullulan, the carbodiimide, N-hydroxysuccinimide * carbodiimide and ethyl chlorocarbonate etc were used, binding reaction with the pullulan carboxyl group and drug amino group, After introducing amino group to hydroxyl of pullulan, carbodiimide etcwas used, binding reaction with pullulan amino group and drug carboxyl group, And after introducing amino group to hydroxyl of pullulan, cyanuryl chloride etc was used, pullulan amino group and binding reaction etc with drug amino group. It is useful in order to produce drug-pullulan-bound carrier formulation. Furthermore, as for proportion of pullulan and drug is notsomething which especially is limited, but proportion of 10 mole% isdesirable from 0.1 vis-a-vis hydroxyl of pullulan.

[0017] Drug -pullulan-bound carrier formulation of this invention it is a water solubility, it can melt in buffer, the physiological saline and injectable solvent or other diluent that way and can use for assay or remedy, butafter after lyophilizing, melting in diluent when using, it is possibleto use.

[0018] Drug -pullulan water-soluble carrier formulation of this invention has following property which is superior incomparison with starting drug

- 1) inside the body stability of unstable drug increases remarkably.
- 2) internal dynamics of drug it can change. Especially, targeting ability to liver increases remarkably, by comparisonwith starting drug, drug effect is shown with a less drug dose.
- 3) drug effect in liver continues, by comparison with the starting dru

る。

【0019】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明について詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0020】

【実施例1】50mgのプルラン（分子量200,000、東京化成工業（株）製）を含む3mlの水溶液中へ20mg/ml濃度の塩化シアヌルのジメチルホルムアミド溶液1mlを加えた。pHを8.5に調整した後、氷浴中、3時間、攪拌することにより、プルランの水酸基へシアヌル残基を導入した。反応後、ゲルfiltration（PD-10 Column, Sephadex G-25, Pharmacia Biotech社製）にて未反応の塩化シアヌルを除去した。ゲルfiltrationに用いる溶出液は、pH7.0の0.05Mの塩化ナトリウムを含む0.05Mのリン酸緩衝溶液（PB）である。この反応条件下におけるシアヌル残基のプルラン水酸基への導入率は1.5モル%（シアヌル残基/水酸基）であった。次に、10mg/ml濃度のシアヌル化プルランのPB溶液1ml中へ、卵白リゾチーム〔和光純薬工業（株）製〕（以下、Lyzとする）溶液1ml（40μg/ml）を投入し、Lyzとプルランとを結合させた。結合反応の条件は、4°C、12時間、pH7.0である。反応生成物のゲルfiltration（Sephacryl-S200、0.5cm内径、36cm長のカラム、溶出液PB、溶出速度0.33ml/min）を行い、結合していない遊離LyzをLyz-プルラン結合体から分離除去した。Lyz-プルラン結合体のタンパク質量（Lyz量）および糖質量（プルラン量）を、それぞれ、Bio-Rad Protein Assay法およびアンスロン-硫酸法にて定量したところ、プルランの回収率は95%であり、結合体へ結合されているタンパク質量は、仕込みタンパク質量の46%であった。Lyz-プルラン結合体のLyz活性をin vitroにおけるそのキチン誘導体の加水分解活性から評価（Imoto, T., 等, Agr. Biol. Chem., 35巻, 1154, 1971）したところ、結合反応前後におけるLyz活性の回収率は25.4%であった。

【0021】

【実施例2】用いるタンパク質がトリプシン〔和光純薬工業（株）製〕（以下、Tryとする）である以外は、実施例1と同様の方法でTry-プルラン結合体を作製した。得られたTry-プルラン結合体のタンパク質量（Try量）および糖質量（プルラン量）を、それぞれ、Bio-Rad Protein Assay法およびアンスロン-硫酸法にて定量したところ、プルランの回収率は97%であり、結合体へ結合されているタンパク質量は、仕込みタンパク質量の55%であった。Try-プルラン結合体のTry活性をin vitroにおけるその人工基質（p-toluenesulfonyl-L-alginate-methyl ester）の加水分解活性から評価（Walsh, K. A.,

g longer.

[0019]

[Working Example(s)] Below, listing Working Example, you explain in detail concerning this invention, but this invention is not something which eye fixed is done in Working Example below.

[0020]

[Working Example 1] Dimethylformamide solution 1 ml of cyanuryl chloride of 20 mg/ml concentration was added to in 3 ml aqueous solution which includes pullulan (molecular weight 200,000 and Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd. (DN 69-058-7365) make) of 50 mg. After adjusting pH 8.5, cyanuryl residue was introduced to the hydroxyl of pullulan in ice bath, 3 hours, by agitating. After reacting unreacted cyanuryl chloride was removed with gel filtration (PD-10 Column, Sephadex G-25, Pharmacia Biotech supplied). eluate which is used for gel filtration is phosphate buffer solution (PB) of 0.05M which includes sodium chloride of 0.05M of pH 7.0. introduction ratio to pullulan hydroxyl of cyanuryl residue in under this reaction condition was 1.5 mole% (cyanuryl residue / hydroxyl). Next, it threw egg white lysozyme [Wako Pure Chemical Industries Ltd. (DN 69-059-8875) make] (Below, Lyz it does) solution 1 ml (40 μg/ml) to in PB solution 1 ml of cyanurated pullulan 10 mg/ml concentration, connected with Lyz and pullulan. condition of binding reaction, is 4 °C, 12 hours and pH 7.0. gel filtration (column of Sephadex -S200 and 0.5 cm internal diameter, 36 cm long, eluate PB and elution rate 0.33 ml/min) of reaction product was done, release Lyz which has not been connected separation and removal was done from Lyz-pullulan bound carrier. amount of protein (amount of Lyz) and amount of polysaccharide (amount of pullulan) of Lyz-pullulan bound carrier, respectively, with BioRad Protein Assay method and the anthrone-sulfuric acid method when quantification it does, recovery ratio of pullulan was the 95 %, amount of protein which is connected to bound carrier was 46 % of the amount of added protein. When you appraise (Agricultural and Biological Chemistry (ISSN 0002-1369, CODEN ABCHA6), Vol.35 and 1154, 1971 such as Imoto, T.,) from hydrolysis activity of chitin derivative in Lyz activity of the Lyz-pullulan bound carrier in vitro, recovery ratio of Lyz activity in approximately binding reaction was the 25.4 %.

[0021]

[Working Example 2] Other than protein which it uses is trypsin [Wako Pure Chemical Industries Ltd. (DN 69-059-8875) make] (Below, Try it does), Try-pullulan-bound carrier was produced with method which is similar to Working Example 1. amount of protein (amount of Try) and amount of polysaccharide (amount of pullulan) of Try-pullulan-bound carrier which is acquired, respectively, with BioRad Protein Assay method and anthrone-sulfuric acid method when quantification it does, there recovery ratio of pullulan was 97 %, amount of protein which is connected to the bound carrier was 55 % of amount of added protein. When you appraise (Methods Enzymol., Vol.19 and 41, 1970 such as Walsh, K.A.,) from hydrolysis activity of artificial substrate (p-toluenesulfonyl-L-alginate-methyl ester)

等、Methods Enzymol., 19巻、41、1970) したところ、結合反応前後における Try 活性の回収率は 44.4% であった。

【0022】

【実施例 3】用いるタンパク質がミオグロビン和光純薬工業(株)社製】(以下、Myo とする)である以外は、実施例 1 と同様の方法で Myo-プルラン結合体を作製した。得られた Myo-プルラン結合体のタンパク質量 (Myo 量) および糖質量 (プルラン量) を、それぞれ、Bio-Rad Protein Assay 法およびアンスローネ硫酸法にて定量したところ、プルランの回収率は 96% であり、結合体へ結合されているタンパク質量は、仕込みタンパク質量の 60% であった。

【0023】

【実施例 4】162 mg のプルラン (分子量 200,000、東京化成工業(株)製) を含む 5 ml の水溶液中へ、異なる濃度をもつ過ヨウ素酸ナトリウム水溶液 5 ml を加えた。4°C、12 時間、遮光下にて攪拌することにより、プルランへアルデヒド基を導入した。反応後、水に対して 4°C、2 日間透析することにより、未反応の過ヨウ素酸ナトリウムを除去した。加える過ヨウ素酸ナトリウムのプルラングルコース残基に対するモル分率を 1/60, 1/40, 1/20, 1/10, および 1/5 とした場合には、プルランへのアルデヒド残基の導入率は、それぞれ、0.8, 1.0, 1.0, 1.3, および 1.3 モル% (アルデヒド残基/グルコース残基) となった。次に、50 mg/ml 濃度の酸化プルラン (アルデヒド導入率 1.0 モル%) の水溶液 1 ml 中へ、8.0 mg/ml 濃度の Lyz ほう酸緩衝溶液 (pH 9.0, 0.2 M) 1 ml を投入し、Lyz とプルランとを結合させた。反応時間は 20 時間、温度は 4, 25, および 37°C である。反応終了後、10 mg/ml 濃度のほう素化水素ナトリウムを 0.1 ml 加えた。反応生成物のゲル通過 (Sephacryl-S200, 0.5 cm 内径, 36 cm 長のカラム、溶出液 PB、溶出速度 0.33 ml/min) を行い、Lyz-プルラン結合体より結合していない遊離 Lyz を分離除去した。Lyz-プルラン結合体のタンパク質量 (Lyz 量) および糖質量 (プルラン量) を、それぞれ、Bio-Rad Protein Assay 法およびアンスローネ硫酸法にて定量したところ、反応温度に関係なく、プルランの回収率は 95% であった。結合体へ結合されているタンパク質量は、結合反応温度の上昇とともに増加し、4, 25, および 37°C における結合タンパク質量は、それぞれ、仕込みタンパク質量の 34, 47, および 68% であり、Lyz-プルラン結合体の Lys 活性は仕込み Lyz 活性の 15.9, 20.4, および 35.6% であった。

【0024】

【実施例 5】用いるタンパク質が Try、プルランへのアルデヒド残基の導入率が 1.0 モル% (アルデヒド残基/グルコース残基)、および反応温度が 25°C である以外は、実施

methylester) in Try activity of the Try-pullulan-bound carrier in vitro, recovery ratio of Try activity in approximately binding reaction was the 44.4%.

[0022]

[Working Example 3] Other than protein which it uses is myoglobin Wako Pure Chemical Industries Ltd. (DN 69-059-8875) supplied] (Below, Myo it does), Myo-pullulan-bound carrier was produced with method which is similar to Working Example 1. amount of protein (amount of Myo) and amount of polysaccharide (amount of pullulan) of Myo-pullulan-bound carrier which is acquired, respectively, with BioRad Protein Assay method and anthrone-sulfuric acid method when quantification it does, therecovery ratio of pullulan was 96%, amount of protein which is connected to the bound carrier was 60% of amount of added protein.

[0023]

[Working Example 4] To in aqueous solution of 5 ml which includes pullulan (molecular weight 200,000 and Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd. (DN 69-058-7365) make) of 162 mg, the sodium periodate aqueous solution 5 ml which has concentration which differs was added. aldehyde group was introduced to pullulan due to 4°C, 12 hours and agitating under light blocking. After reacting, unreacted sodium periodate was removed 4°C and by 2 day dialysis doing vis-a-vis water. When molar proportion for pullulan glucose residue of sodium periodate in addition it makes the 1/60, 1/40, 1/20, 1/10, and 1/5, introduction ratio of aldehyde residue to pullulan, respectively, became 0.8, 1.0, 1.0, 1.3, and 1.3 mole% (aldehyde residue / glucose residue). Next, it threw Lyz boric acid buffer solution (pH 9.0, 0.2M) 1 ml of 8.0 mg/ml concentration to in aqueous solution 1 ml of oxidized pullulan (aldehyde introduction ratio 1.0 mole%) of the 50 mg/ml concentration, connected with Lyz and pullulan. As for reaction time as for 20 hour and temperature it is a 4, a 25, and a 37°C. After reaction termination, sodium borohydride of 10 mg/ml concentration 0.1 ml was added. gel filtration (column of Sephacryl-S200 and 0.5 cm internal diameter, 36 cm long, eluate PB and elution rate 0.33 ml/min) of reaction product was done, release Lyz which has not been connected separation and removal was done from Lyz-pullulan bound carrier. amount of protein (amount of Lyz) and amount of polysaccharide (amount of pullulan) of Lyz-pullulan bound carrier, respectively, with BioRad Protein Assay method and the anthrone-sulfuric acid method when quantification it does, recovery ratio of pullulan was 95% regardless of reaction temperature. binding protein quantity where amount of protein which is connected to bound carrier increases, with rise of binding reaction temperature in 4, 25, and the 37°C, respectively, 34 of amount of added protein, was 47, and the 68%, Lys activity of Lyz-pullulan bound carrier was 15.9, 20.4, and 35.6% of the addition Lyz activity.

[0024]

[Working Example 5] Protein which it uses being Try, introduction ratio of aldehyde residue to the pullulan being 1.0 mole% (aldehyde residue / glucose residue), and other than reaction temperature is 25

例4と同様の方法でTry-プルラン結合体を作製した。得られたTry-プルラン結合体のプルランの回収率は94%であり、結合体へ結合されているタンパク質量は、仕込みタンパク質量の49%であった。Try-プルラン結合体のTry活性を測定したところ、結合反応前後におけるTry活性の回収率は44.4%であった。

[0025]

【実施例6】実施例1で作製した水溶性のLyz-プルラン結合体をマウス尾静脈内へ投与した後の体内分布を調べた。Lyz濃度として20 μ g/mlの遊離LyzおよびLyz-プルラン結合体のPB溶液100 μ lと200 μ lの0.5Mリン酸緩衝溶液(pH7.5)を混合した。この溶液中へ4 μ lのNa¹²⁵I(3.7GBq/ml 0.1M NaOH solution, NEN Research Products社製)を加えた。0.2mg/ml濃度のクロラミンTの0.05Mリン酸緩衝溶液(pH7.2)を200 μ l加えた後、室温にて2分間、ラベル化反応を行った。次に、200 μ lの4mg/ml二亜硫酸ナトリウムのPB溶液を加えて反応を停止させた。陰イオン交換樹脂(Dowex 1-X8)を詰めたカラムに反応物を通過させ、ラベル化されていない¹²⁵I-を分離除去し。このようにして得られた¹²⁵Iラベル化遊離Lyzあるいは¹²⁵Iラベル化Lyz-プルラン結合体をBalb/cマウス(9週齢、メス、三匹/グループ)の尾静脈内へ投与した。投与1、3、および24時間後に、血液、心臓、肺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、胃腸管、甲状腺、それ以外の部位、および尿、糞などを回収し、それぞれの臓器の放射活性をガンマカウンターにて計測した。結果を表1に示す。

[0026]

°C, the Try-pullulan-bound carrier was produced with method which is similar to Working Example 4. recovery ratio of pullulan of Try-pullulan-bound carrier which is acquired was the 94%, amount of protein which is connected to bound carrier was 49% of the amount of added protein. When Try activity of Try-pullulan-bound carrier was measured, recovery ratio of Try activity in approximately binding reaction was 44.4%.

[0025]

【Working Example 6】 After prescribing water soluble Lyz-pullulan bound carrier which is produced with Working Example 1 to inside the mouse tail vein inside the body distribution was inspected. release Lyz of 20 μ g/ml and PB solution 100 μ l of Lyz-pullulan bound carrier and 0.5M phosphate buffer solution (pH 7.5) of the 200 μ l were mixed as Lyz concentration. Na ¹²⁵I (3.7 GBq/ml 0.1 M NaOH solution, NEN Research Products supplied) of 4 μ l was added to in this solution. 200 μ l after adding 0.05M phosphate buffer solution (pH 7.2) of chloramine T of 0.2 mg/ml concentration, 2 min and labelling reaction were done with room temperature. Next, reaction was stopped including PB solution of 4 mg/ml sodium bisulfite of the 200 μ l. separation and removal it does ¹²⁵I- which passing reaction product cool in column, the labelling has not been done anionic exchange resin (Dowex 1-X8). It made this way and it prescribed ¹²⁵I labelling release Lyz or ¹²⁵I labelled Lyz-pullulan bound carrier which is acquired to inside tail vein of Balb/c mouse (9 weeks old, scalpel and three animals/group). Dosage 1, after 3, and 24 hours, blood, the heart, lung, thymus, liver, spleen, kidney, the gastrointestinal tract and thyroid, site, and urine and droppings etc other than that it recovered, measured radioactivity of respective organ with gamma counter. Result in Table 1 Shimesu.

[0026]

【表 1】

[Table 1]

臓器	放射活性 (%)					
	遊離 L y z			L y z - プルラン結合体		
	1hr	3hr	24hr	1hr	3hr	24hr
血液	6.26±1.12	4.67±1.05	0.14±0.06	9.73±1.69	2.74±0.43	0.39±0.04
心臓	0.09±0.03	0.07±0.02	ND	0.11±0.02	0.03±0.00	0.01±0.00
肺	0.16±0.02	0.19±0.12	0.02±0.01	0.42±0.02	0.10±0.01	0.03±0.00
腎臓	0.05±0.00	0.03±0.00	ND	0.08±0.03	0.03±0.00	ND
肝臓	1.39±0.21	0.99±0.32	0.18±0.02	46.01±0.84	29.62±0.30	12.55±0.39
脾臓	0.21±0.10	0.26±0.12	0.15±0.09	2.61±0.29	0.94±0.06	1.18±0.25
腎臓	1.47±0.16	0.92±0.35	0.05±0.00	1.48±0.36	0.45±0.00	0.14±0.00
胃腸管	13.09±0.95	10.52±7.82	0.53±0.08	14.48±4.20	6.78±1.07	1.75±0.07
甲状腺	0.08±0.08	1.34±1.84	1.61±1.18	0.05±0.06	0.79±0.52	ND
その他の部分	17.85±2.49	26.08±10.25	6.54±0.53	13.06±4.81	12.67±1.35	11.88±1.47
排泄物	35.1±0.00	47.93±0.00	49.74±0.00	10.57±0.00	22.99±0.00	59.19±0.00

[ND=検出できず]

遊離 L y z および L y z - プルラン結合体の静脈内投与後の体内分布

【0027】体内分布に明らかな違いが認められる臓器は、肝臓ならびに脾臓であり、プルランにて化学修飾することにより、L y z の蓄積量が遊離 L y z に比較して有意に高くなっている。この高い肝臓への蓄積量は、投与 24 時間後においても認められた。それ以外の臓器に関しては、遊離 L y z と L y z - プルラン結合体との間に大きな差は認められなかった。これらの結果は、L y z をプルランにて化学修飾することにより、肝臓への L y z のターゲティングが達成できることを示している。また、遊離 L y z に比較して、肝臓における L y z の滞留性も延長されていた。

【0028】

【実施例 7】実施例 2 で作製した水溶性 T r y - プルラン結合体をマウス尾静脈内へ投与した後の体内分布を調べた。タンパク質としてトリプシンを用いた以外は実施例 6 と同じである。遊離 T r y および T r y - プルラン結合体の肝臓における放射活性の蓄積率(%)は、それぞれ、1. 9.8±0.10 および 46. 1.9±0.68 (投与 1 時間後)、0. 4.5±0.15 および 32. 7±0.19 (投与 3 時間後)、および 0. 3.2±0.10 および 10. 9±0.67 (投与 24 時間後) であった。このように、プルランにて化学修飾することにより、遊離 T r y 比較して、T r y の肝臓への蓄積量が有意に高くなっている。この高い肝臓への蓄積量は、投与 24 時間後においても認められた。それ以外の臓器に関しては、遊離 T r y と T r y - プルラン結合体との間に大きな差は認められなかった。また、遊離 T r y に比較して、肝臓における T r y の滞留性も延長されていた。

[0027] Organ where it can recognize clear difference in inside the body distribution is liver and spleen, by chemical modification doing with the pullulan, stored amount of Lyz it has become high significantly by comparison with free Lyz. stored amount to this high liver was recognized in after dosage 24 hours. In regard to organ other than that, big difference was not recognized with free Lyz and Lyz-pullulan bound carrier. These results have shown fact that it can achieve targeting of the Lyz to liver Lyz by chemical modification doing with pullulan. In addition, by comparison with free Lyz, also residence of Lyz in liver was done lengthening.

[0028]

[Working Example 7] After prescribing water solubility Try-pullulan-bound carrier which is produced with Working Example 2 to inside the mouse tail vein inside the body distribution was inspected. Other than using trypsin as protein, it is same as Working Example 6. accumulation (%) of radioactivity in liver of free Try and Try-pullulan-bound carrier, respectively, 1.98±0.10 and 46.19±0.68 (after dosage 1 hour), 0.45±0.15 and 32.7±0.19 (Rear of dosage 3 hours), and was 0.32±0.10 and 10.9±0.67 (after dosage 24 hours). This way, free Try comparing by chemical modification doing with pullulan, the stored amount to liver of Try has become high significantly. stored amount to this high liver was recognized in after dosage 24 hours. In regard to organ other than that, big difference was not recognized with free Try and Try-pullulan-bound carrier. In addition, by comparison with free Try, also residence of Try in liver was lengthening.

【0029】

【発明の効果】本発明によって薬物に肝臓へのターゲティング性を付与させることができるならば、薬効発現のための薬物投与量を低下でき、その結果、薬物の大量投与、およびその標的指向性の低さに原因する副作用を低減することができる。肝臓癌肝炎に対する抗ガン剤、抗炎症剤による治療の他、肝臓に関する細菌あるいはウイルス感染症の予防薬、治療薬としての用途が期待できる。

[0029]

[Effects of the Invention] If to drug targeting ability to liver can be granted is with the this invention, drug dose for manifestation of drug effect be able to decrease. As a result, side effect which cause is done can be decreased in lowness of drug large dose administration, and its target indicator characteristic. You can expect application other than remedy due to anticancer agent and the antiinflammation agent for liver cancer hepatitis, as prevention drug, therapeutic of bacterial or viral infection regarding the liver.